

Trabajo Fin de Grado

Influencia de la presencia de cloruros en matrices reales (complementos alimenticios de animales) a la hora de determinar su contenido en Ag por técnicas espectroscópicas

Influence of the presence of chlorides in real matrices (food supplements for animals) when determining their Ag content by spectroscopic techniques

Autor/es

Raquel Magallón Sanz

Director/es

José María Mir Marín

Universidad de Zaragoza
Facultad de ciencias, Departamento de Química Analítica
2018/2019

RESUMEN

La plata tiene una amplia variedad de aplicaciones, una de las más interesantes es que se puede encontrar como aditivo en muchos de los suplementos alimenticios en dietas de animales debido a su eficiencia como antimicrobiano.

Aunque existen varias técnicas que permiten su determinación, en este estudio se va a establecer un método para la cuantificación de plata en tres muestras distintas de heces porcinas. Este método es la espectroscopía de absorción atómica con llama. Para ello, primeramente, se va a llevar a cabo la calibración del instrumento y la optimización de los parámetros de exactitud, sensibilidad y precisión.

Uno de los retos que se presentan, es el establecimiento de un procedimiento de digestión que aporte buenos rendimientos. Revisados los distintos métodos de disolución de este tipo de muestras, se va a establecer la digestión ácida con ácido nítrico como método de referencia. También se va a decidir si la digestión con ácido clorhídrico y agua regia es adecuada y a estudiar la influencia de los cloruros a la hora de la determinación de plata en las muestras debido a la posible pérdida de sensibilidad por la precipitación del AgCl(s) .

Una vez que se ha elegido la digestión ácida con ácido nítrico como método de referencia, se va a proceder a la validación de este método por medio del estudio de la presencia de efectos matriz y el estudio de recuperación.

ABSTRACT

Silver has a wide variety of applications, one of the most interesting is that it can be found as an additive in many of the food supplements in animal diets because of its efficiency as an antimicrobial.

Although there are several techniques that allow its determination, this study tries to establish a method for the quantification of silver in three samples of porcine faeces. This method is flame atomic absorption spectroscopy. For this, first of all, the calibration of the instrument and the optimization of the parameters of accuracy, sensitivity and precision, will be carried out

One of the challenges that arise, is the establishment of a digestion procedure that provides good yields. After reviewing the various methods of dissolving this type of samples, the acid digestion with nitric acid is to be established as a reference method. It will also be decided whether acid digestion with hydrochloric acid is appropriate and to study the influence of chlorides in the determination of silver in the samples.

Once acid digestion with nitric acid has been chosen as a reference method, this method is to be validated through the study of the presence of matrix effects and the recovery study.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Propiedades y aplicaciones de la plata	3
1.2 Métodos de determinación de plata	3
1.3 Digestión de muestras sólidas	4
1.4 Influencia de la presencia de cloruros en disolución	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y REACTIVOS	6
3.1 Instrumentación	6
3.2 Aparatos	6
3.3 Materiales	6
3.4 Reactivos	6
4. PARTE EXPERIMENTAL	7
4.1 Optimización de parámetros instrumentales y cálculo de parámetros analíticos	7
4.2 Métodos de disolución de muestras	9
4.2.1 Digestión de la muestra con ácido nítrico	9
4.2.2 Digestión de la muestra con ácido clorhídrico	9
4.3 Influencia de los reactivos de digestión en la determinación cuantitativa	10
4.3.1 Ácido nítrico	10
4.3.2 Agua regia	11
4.3.2.1 Influencia de la presencia de cloruros en disolución	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1 Determinación de plata en EAA-LLAMA	14
5.2 Cálculo de la incertidumbre	15
6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	17
6.1 Estudio del efecto matriz	17
6.2 Estudio de la recuperación	25
7. CONCLUSIONES	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27

1. INTRODUCCIÓN

En esta memoria se presenta el trabajo desarrollado para la determinación de plata en muestras de heces porcinas liofilizadas mediante espectroscopía de absorción atómica con llama. Los intereses de este estudio son, establecer la digestión de las muestras con ácido nítrico como método de referencia, analizar la influencia de la presencia de cloruros en la determinación de la plata, y finalmente, determinar el contenido en plata de las diferentes muestras mediante el procedimiento de referencia.

1.1. Propiedades y aplicaciones de la plata

A diferencia de otros metales, la plata es capaz de reaccionar con ácidos oxidantes y así dar lugar a su ión monopositivo (Ag^+). La forma iónica es el estado más común en el que se va a encontrar este elemento y el que en la mayoría de los casos hace posible su determinación. Cuando se quiere determinar Ag^+ , hay que tener algunas precauciones ya que puede haber pérdidas de este ión por formación de coloides, sorción o aparición de precipitados. Esto sucede cuando hay presencia de cloruros ya que se forma un precipitado blanquecino que corresponde a AgCl(s) . Esto tiene lugar cuando la concentración de cloruros no está en exceso [2].

Además, la manipulación de las disoluciones de plata es rigurosa ya que hay que controlar muy bien que el almacenaje de estas sea en ausencia de luz para asegurar su estabilidad.

La plata tiene un rango amplio de aplicaciones ya que puede usarse como metal precioso en la industria, como componente de los filtros utilizados para la depuración y purificación del agua de boca o para el procesamiento de alimentos o medicamentos [1][2]. Pero una de sus propiedades más importantes es su poder antimicrobiano ya que es capaz de alterar las propiedades de la pared bacteriana, así como interrumpir los mecanismos de replicación de las células procariotas. Este efecto hace que sea utilizado como aditivo en las dietas de los ganados siendo más común en el ganado porcino. Lo que interesa es que estos aditivos no se acumulen en el organismo de los cerdos y que se eliminen con facilidad, lo cual ha sido probado por algunos estudios concluyéndose que no se detecta acumulación en el músculo esquelético ni en el hígado. Las concentraciones que pueden tolerar los cerdos y que están legisladas son del orden de $100 \mu\text{g/Kg}_{\text{alimento}}$ [4].

1.2. Métodos de determinación de plata

Uno de los métodos que ofrece mejores resultados en la determinación de plata es AES-ICP (Espectroscopía de Emisión Atómica mediante Acoplamiento de Plasma Inductivo). Se basa en la presencia de un plasma de Argon donde se ionizan los átomos de una muestra líquida. Los iones que se forman emiten luz a diferentes longitudes de onda que son medidas. Este método permite obtener una gran sensibilidad y bajos límites de detección, del orden de $\mu\text{g/L}$ o ng/L [4]. Es el más utilizado para la determinación de nanopartículas de plata.

El ICP-MS, al igual que el anterior, también es capaz de detectar concentraciones muy bajas de analito dando lugar a límites de detección del orden de $\mu\text{g/L}$ o ng/L y está basado en la detección de iones en función de su relación masa/carga.

Otro método cuyo uso para la determinación de plata está muy extendido es FAAS (Espectroscopía de Absorción Atómica con Llama). El proceso que tiene lugar es la absorción de

energía por parte de un átomo que se encuentra en su estado fundamental, provocando su transición a un estado excitado de mayor energía. Como fuente de radiación se usan lámparas de plata de cátodo hueco. A diferencia de los dos anteriores, tiene menor sensibilidad y límites de detección más altos, del orden de mg/L [3][5]. En algunos casos es necesario un tratamiento de muestra más complejo para eliminar interferencias. Para la determinación de plata es necesario el ajuste de la longitud de onda a 328,07 nm. Este es el método que se ha utilizado en este estudio.

Por último, también existen estudios donde se ha utilizado GFAAS (Espectroscopía de Absorción Atómica con horno de grafito) pero en ellos se indica que es necesaria la adición de HClO_4 (70%) y no se obtienen valores de recuperación, por lo que podría no ser un método adecuado [2].

1.3 Digestión de muestras sólidas [2][4][8]

En el ámbito biológico, algunas de estas muestras pueden ser tejidos, heces de animales, alimentos, etc. Antes de llevar a cabo la determinación cuantitativa de un analito, es necesaria la disolución de estas muestras.

Para la determinación de plata en tejidos de animales se lleva a cabo la digestión asistida por microondas de la muestra y se adiciona una mezcla de HNO_3 y H_2O_2 . Una vez que se ha producido la descomposición, se adiciona ácido clorhídrico.

Para la determinación de plata en alimentos, se lleva a cabo una extracción tipo soxhlet donde se introduce la muestra y una cantidad de éter de petróleo como disolvente no polar. A continuación, se deja secar 8h a 650°C y después se hidroliza con HNO_3 (50%) a una temperatura de 100°C durante aproximadamente 1h. Por último, se hace una filtración para separar fracciones sólidas.

En el caso en el que se quiera determinar plata en heces de animales, se lleva a cabo una digestión ácida con HNO_3 a alta temperatura (80-100°C) durante 30 o 45 minutos [13]. Si es necesario habrá que filtrar la disolución o separarla de fracciones sólidas mediante centrifugación.

Otra forma de digestión estudiada para la determinación de plata es una mineralización con HNO_3 , a la que se añade HClO_4 y por último se adiciona NH_4OH . Este método es más utilizado cuando se requiere la determinación de nanopartículas de plata [2].

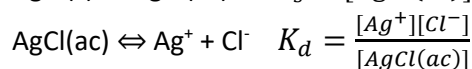
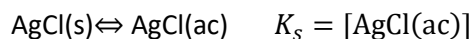
El agua regia es una mezcla oxidante de HNO_3 y HCl en proporción 1:3 que se emplea para digestiones de muestras sólidas. En muchas ocasiones este método es adecuado para el tratamiento de muestras biológicas de las que queremos determinar algún metal, por ejemplo, la plata, ya que esta mezcla es capaz de disolverlos.

1.4 Influencia de la presencia de cloruros en disolución [6]

Como se ha comentado anteriormente, cuando las muestras son tejidos, alimentos o heces no liofilizadas se adiciona HCl para así mejorar las recuperaciones. Cuando las muestras están liofilizadas, no es necesario.

La importancia de saber cómo influye la concentración de cloruros en una disolución acuosa donde también hay iones plata, radica en saber qué cantidad de cloruros hay que añadir a la disolución para que el precipitado de cloruro de plata que se forma pueda redisolverse.

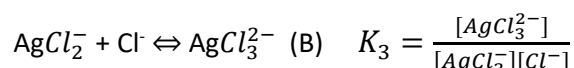
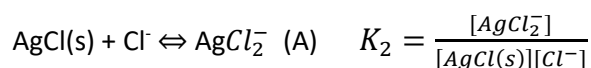
Para explicar este hecho es importante tener en cuenta los equilibrios de reacción que tienen lugar en la disolución. Al lado de las reacciones se presentan las expresiones de las constantes de equilibrio que las describen [7].



$$K_{ps} = K_s K_d$$

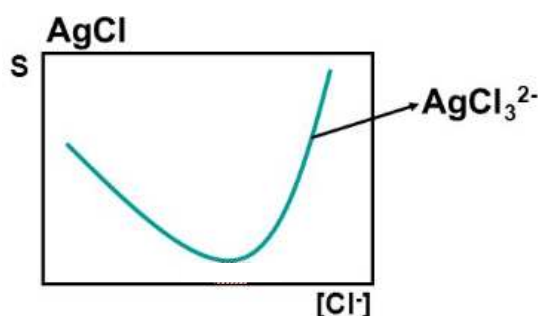
La primera de estas reacciones describe el momento en el que el precipitado de AgCl(s) está en equilibrio con su forma en disolución. En este momento la especie en disolución no se ha disociado en sus iones, a diferencia de en la segunda reacción donde esa disociación ya se ha producido.

Una vez que el precipitado ya se ha formado, este puede volver a desaparecer ya que su solubilidad va disminuyendo a medida que se va añadiendo mayor concentración de iones cloruro. Esto se debe a la aparición de complejos solubles (AgCl_2^- y AgCl_3^{2-}) que provocan un aumento de la solubilidad. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



Como se puede observar en el equilibrio (A), cuando se añade mayor concentración de Cl^- el equilibrio se desplaza a la derecha dando lugar al complejo soluble AgCl_2^- . Lo mismo ocurre con el equilibrio (B).

Este efecto también se puede observar en la siguiente gráfica, la cual ayuda a comprender el porqué de la redisolución del precipitado.



[12]Figura 1: relación entre solubilidad y $[\text{Cl}^-]$

La expresión que relaciona la solubilidad y la concentración de iones cloruro (C_{Cl^-}) es la que sigue:

$$S = \frac{K_{ps}}{K_d} + \frac{K_{ps}}{C_{\text{Cl}^-}} + K_2 C_{\text{Cl}^-} + K_2 K_3 C_{\text{Cl}^-}^2$$

Para encontrar el mínimo que se observa en la gráfica, se realiza la derivada de la anterior expresión y se iguala a cero obteniéndose la siguiente expresión. De la cual se puede obtener el valor de C_{Cl^-} :

$$2 K_2 K_3 C_{\text{Cl}^-}^3 + C_{\text{Cl}^-}^2 - K_2 - K_{ps} = 0$$

2. OBJETIVOS

1. Establecer un método analítico para la determinación de plata mediante espectroscopía de absorción atómica con llama (EAA-llama). Con lo cual, se optimizarán los parámetros instrumentales (intensidad de la fuente de excitación, anchura de rendija, ganancia y longitud de onda) y los parámetros analíticos (recta de calibrado, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad, rango lineal e incertidumbre). El método optimizado será utilizado como referencia durante todo el trabajo.
2. Establecer las condiciones óptimas para la disolución del contenido de las muestras de heces porcinas liofilizadas usando ácido nítrico. Esta forma de disolución será utilizada como referencia.
3. Estudiar la influencia del contenido de cloruros en las muestras utilizando como referencia el método de disolución con ácido nítrico.
4. Determinar el contenido de plata en tres muestras reales. Una de ellas va a ser el blanco ya que no contiene el analito.
5. Llevar a cabo la validación del método anterior realizando los estudios de la presencia de efectos matriz y de recuperación.

3. MATERIALES Y REACTIVOS

3.1 Instrumentación

- Espectrómetro de absorción atómica con llama (Perkin Elmer Aanalist 200)
 - Lámpara de plata de cátodo hueco (Photron, Perkin Elmer Lamp, Ag, silver, Serial No. 8535)
- Balanza analítica (Mettler Toledo AG245, d=0,01 mg /0,1 mg)

3.2 Aparatos

- Placa calefactora (P. Selecta Recisplac C. 157)
- Centrífuga (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge X1R Centrifuge)

3.3 Materiales

- Micropipeta 100 y 200 μ L
- Pipetas de 5 y 10 ml (Bibby Sterilin)
- Vasos de precipitados
- Vidrio de reloj
- Tubos de centrífuga con faldón y sin faldón de 15 ml
- Papel de aluminio

3.4 Reactivos

- Estándar de plata (Silver Standard AgNO_3 (1000 mg/L))
- Ácido nítrico (65% w/w)
- Ácido clorhídrico (36,5-38,0 %)
- Agua regia, $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ (1:3) a partir de los anteriores

- Agua ultrapura (Milli Q)

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Optimización de parámetros instrumentales y cálculo de parámetros

analíticos

Para llevar a cabo la calibración del espectrofotómetro de absorción atómica con llama es necesario la preparación de disoluciones patrón de plata a partir de una solución estándar de plata de concentración conocida. La concentración de la disolución estándar de plata utilizada es de 1000 mg/L.

- Preparación de las disoluciones patrón de plata.

Se toma la cantidad adecuada de estándar de plata (1000 mg/L) con micropipeta y se introduce en un tubo graduado enrasando con agua ultrapura (Mili-Q) hasta un volumen final de 10 ml. Una vez enrasado, el tubo se envuelve con papel de aluminio para evitar la exposición de la plata a la luz, ya que de ser así se podría producir la descomposición de los iones Ag^+ a través de su reacción de reducción.

También es necesario la preparación de una disolución de blanco a la cual no se añade disolución estándar, solo se añade agua ultrapura hasta enrasar al volumen final de 10 ml.

Para obtener la recta de calibrado necesaria, es decir, la relación entre la señal de absorbancia y la concentración de plata, las disoluciones ya preparadas son medidas en absorción atómica con llama bajo las siguientes condiciones que son preestablecidas por el fabricante [10].

Longitud de onda: 328,07 nm
 Anchura de rendija: 2,7-0,8 nm
 Caudal aire/acetileno: 10/2,5 (u.a)
 Ganancia: 63 eV

Los valores de absorbancia obtenidos para cada valor de concentración son los siguientes:

Concentración estándar de plata (1000 mg/L) mg/L	Volumen estándar de plata (1000 mg/L) μL	Señal (ABS)	DSR %
0	0	0,001	1,4
1	10	0,039	0,2
2	20	0,061	0,6
5	50	0,139	0,5
7	70	0,206	0,7
8	80	0,229	1,3
10	100	0,236	1,7
12	120	0,289	0,8
15	150	0,396	0,7
20	200	0,439	1,6
25	250	0,519	0,4

Tabla 1: concentraciones de estándar de plata y absorbancias para la recta de calibrado

Tras la realización del ajuste fino de la recta y eliminar los dos últimos puntos (ver Anexo 1) ya que no pertenecen al rango lineal de la recta, la relación lineal entre la señal y la concentración es la que sigue:

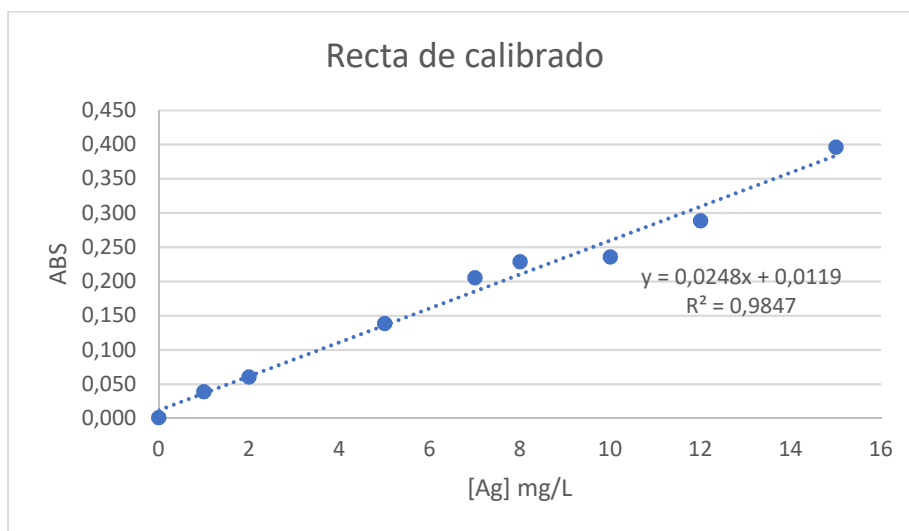


Figura 1: Recta de calibrado para la optimización de parámetros analíticos e instrumentales

La recta de calibrado obtenida es $y = 0,0248x + 0,0119$

Tras la obtención de la recta de calibrado a partir de los datos de concentración asociados a una señal de absorbancia, se procede al cálculo de los parámetros analíticos.

- Límite de detección: $LD = \frac{3S_{blanco}}{Pte} = 0,0697 \text{ mg/L}$
- Límite de cuantificación: $LC = \frac{10 S_{blanco}}{Pte} = 0,232 \text{ mg/L}$
- Sensibilidad de calibrado= Pendiente = 0,0248
- Sensibilidad analítica= $\frac{Pendiente}{S_{señal}} = \frac{0,0248}{0,129} = 0,192$
- Rango lineal: desde el límite de cuantificación (0,0697 mg/L) hasta 15 mg/L
- Coeficiente de correlación (R^2): 0,9847

4.2 Métodos de disolución de muestras

Las muestras de las que se disponen son heces de ganado porcino liofilizadas de tres cuadras diferentes. Su contenido en materia orgánica, aunque en baja concentración ya que están liofilizadas, puede dificultar la disolución. Por eso es necesario hacer un estudio anterior a la determinación cuantitativa de plata, sobre cuál es la forma óptima para llevar a cabo la digestión total de la muestra y así pasar de una muestra sólida a una muestra líquida con el mayor rendimiento posible.

Los dos métodos seleccionados para hacer este estudio han sido la digestión con ácido nítrico y con ácido clorhídrico.

4.2.1 Digestión de la muestra con ácido nítrico

Para llevar a cabo esta digestión ácida se pesan 0,0109 g de la cuadra 1 en un vaso de precipitados, se añaden 2,5 ml de HNO_3 (65%) y se calienta a 80°C [13]. Este proceso dura aproximadamente 30 minutos. Durante este tiempo lo que ocurre en la reacción es un proceso de oxidación-reducción. El HNO_3 es un oxidante fuerte por lo que si en la muestra hay Ag^0 este se va a oxidar dando lugar a Ag^+ y, por consiguiente, el HNO_3 se reduce a NO_2 dando lugar a unos vapores de color anaranjado, por lo que es imprescindible hacer esta reacción en vitrina. En el comienzo de la reacción, cuando todavía hay materia orgánica sin disolver, el color de la disolución es naranja y se aprecia la aparición de espumas, pero cuando va transcurriendo el tiempo, la disolución se vuelve de color amarillo y traslúcida. Cuando esto ocurre significa que ya no queda más materia orgánica por disolver y la reacción ha terminado.

4.2.2 Digestión de la muestra con ácido clorhídrico

Para llevar a cabo esta digestión ácida se pesan 0,0145 g de la cuadra 6 en un vaso de precipitados, se añaden 2,5 ml de HCl (36,5-38 %) y se calienta a 80°C. Este proceso tiene una duración aproximadamente de 45 minutos. Lo que se observa es que se forman espumas debido a la digestión de la materia orgánica y la disolución se torna de color negro. Transcurridos los 45 minutos se observa que la mayor parte de la muestra se ha disuelto, pero todavía quedan algunos restos sin disolver, por lo que es necesario llevar a cabo la centrifugación de la mezcla. Este procedimiento se basa en el fraccionamiento de la muestra en función de las densidades aplicando una fuerza centrífuga, el sólido queda en la parte inferior y la muestra, que es lo que interesa, en la parte superior.

Para favorecer la digestión completa de la muestra se añade agua regia, $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ (1:3). De esta manera se consigue la disolución completa gracias a la presencia de HNO_3 .

Tras estas observaciones se puede concluir que la digestión de la muestra con ácido nítrico proporciona mayores rendimientos porque existe una menor probabilidad de que se produzcan pérdidas de analito por una digestión incompleta.

4.3 Influencia de los reactivos de digestión en la determinación cuantitativa

Para la obtención de resultados representativos y reproducibles es necesario realizar un estudio para determinar si la forma en la que se lleva a cabo la digestión de las muestras es adecuada o no, y de qué forma afecta.

4.3.1 Ácido nítrico

Como se ha justificado anteriormente, el método de disolución de las muestras elegido como referencia es la digestión ácida con HNO_3 . Es necesario determinar si la señal que obtenemos por absorción atómica con llama después de llevar a cabo la digestión de la muestra es la que corresponde únicamente a la concentración de plata presente en ella.

Para ello se preparan disoluciones, todas ellas de la misma concentración de estándar de plata (7 mg/L), a las que se añaden volúmenes crecientes de HNO_3 y finalmente se enrasan a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura (Mili-Q). Previamente a la medida se obtiene una recta de calibrado (ver Anexo 2).

Con los datos de concentración y de señal de absorbancia se realiza una representación gráfica y se observa si al aumentar la concentración de HNO_3 añadida, se producen modificaciones en la concentración de plata de la muestra.

[Ag _{estándar}] mg/L	HNO_3 (ml)	[HNO_3] mg/L	ABS	DSR %
7	0	0	0,197	0,7
7	2	196677	0,194	1,8
7	6	590031	0,181	0,3
7	8	786708	0,188	0,6
7	10	983385	0,183	1,3

Tabla 2: valores de concentración de HNO_3 , de absorbancia y de DSR

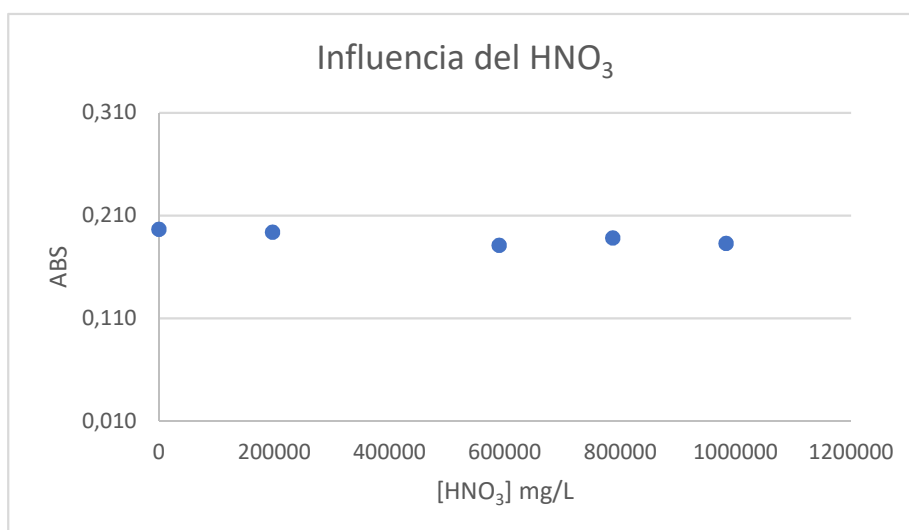


Figura 2: Representación gráfica de la absorbancia frente a la [HNO_3] mg/L

Como se observa en los datos representados, al ir añadiendo a las disoluciones de estándar de plata cantidades crecientes de ácido nítrico, los resultados de absorbancia que se obtienen varían poco entre ellos. Para saber si estos resultados son homogéneos, se calcula la desviación estándar relativa.

Para ello se tiene en cuenta que $DSR = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$, obteniéndose un resultado de DSR=3,19%.

Este valor no es muy elevado lo que significa que los datos son homogéneos, es decir, que hay muy poca dispersión entre ellos, por lo que la media de los datos será representativa de todos ellos.

Teniendo en cuenta este resultado, se puede concluir que los valores de absorbancia no varían al añadir cantidades crecientes de ácido nítrico y por lo tanto si se lleva a cabo la digestión de la muestra con este método, el valor de señal corresponderá únicamente a la concentración de plata presente en las muestras. Este método es tomado como referencia.

4.3.2 Agua regia

Como se ha explicado anteriormente, la digestión de las muestras con ácido clorhídrico no puede considerarse un método adecuado ya que no proporciona buenos rendimientos de disolución. Lo mismo ocurre cuando se utiliza agua regia, ya que a pesar de ser una mezcla de HNO_3 -HCl (1:3), el ácido nítrico no está en la proporción adecuada para que se obtengan resultados comparables al método de referencia ya que queda muestra sin disolver.

En ambos casos, los iones cloruro y los iones plata están en disolución y van a ser capaces de reaccionar entre sí, por ello resulta interesante llevar a cabo el estudio de la influencia de los cloruros en las disoluciones de plata.

4.3.2.1 Influencia de la presencia de cloruros en disolución

Para ver como varía la señal de absorbancia y por tanto la concentración de plata en disolución al añadir concentraciones crecientes de cloruros, se ha llevado a cabo la siguiente experiencia.

Se preparan 13 disoluciones de concentración conocida (10 mg/L) a partir de la disolución estándar de plata (1000 mg/L). Para ello se toman 100 μL de la disolución estándar de plata y se enrasan a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura (Milli Q). Una vez preparadas se cubren con papel de aluminio.

Seguidamente, se añade a cada una distintas concentraciones de HCl (36,5-38%). Al ser un ácido fuerte, el HCl se disocia totalmente dando lugar a la reacción $\text{HCl} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Cl}^-$.

Este hecho permite que el Cl^- esté disponible para dar lugar a las reacciones.

Se pretende que las concentraciones de cloruros que se añaden estén en exceso respecto a la concentración de plata ya que, como se ha explicado anteriormente, al añadir un exceso de cloruros, el precipitado de AgCl(s) formado tras la reacción tiene la capacidad de redisolverse [6].

Tras haber añadido todos los reactivos necesarios, se realiza la medida de absorbancia en el espectrómetro de absorción atómica con llama para después poder obtener el valor de la concentración de plata en la disolución. Es decir, aquella que no se encuentra formando el precipitado. Los valores de concentración se obtienen interpolando los valores de absorbancia en la recta de calibrado.

La recta de calibrado utilizada para esta determinación se ha preparado con concentraciones crecientes de estándar de plata (1000 mg/L) a las cuales se añade 1ml de HCl (36,5-38%) para asegurarse de que estamos en un medio comparable a la experiencia que se quiere realizar. Finalmente se enrasa a un volumen final de 10 ml.

[Ag] _{estándar} mg/L	ABS	DSR %
0	0,001	1,9
1	0,039	0,5
2	0,061	0,8
5	0,139	0,2
7	0,206	1,6
8	0,229	2,5
10	0,236	0,3
12	0,289	0,9
15	0,396	0,2

Tabla 3: Concentraciones de estándar de plata y absorbancias para la recta de calibrado

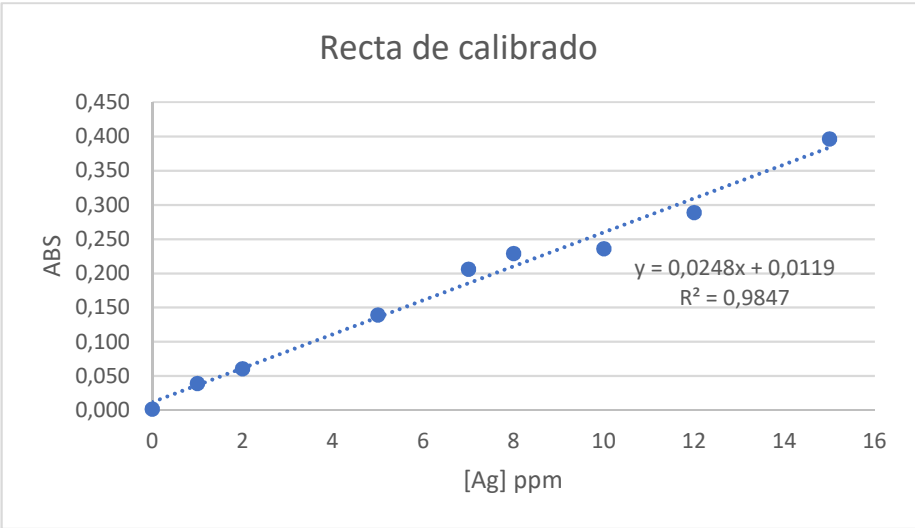


Figura 3: Recta de calibrado para el estudio de la influencia de cloruros

[Ag] mg/L	HCl (ml)	[Cl ⁻] mg/L	ABS	DSR%	[Ag]mg/L
10	0	0	0,194	1,5	7,35
10	2	8,80x10 ⁴	0,173	1,8	6,50
10	3	1,32x10 ⁵	0,170	0,3	6,36
10	4	1,76 x10 ⁵	0,167	0,7	6,26
10	5	2,20 x10 ⁵	0,160	0,2	5,96
10	6	2,64 x10 ⁵	0,158	0,9	5,90
10	8	3,52 x10 ⁵	0,163	1,6	6,08
10	9	3,96 x10 ⁵	0,168	1,7	6,30
10	10	4,40 x10 ⁵	0,178	0,6	6,68
10	11	4,84 x10 ⁵	0,186	0,4	7,02
10	12	5,28 x10 ⁵	0,191	1,9	7,20
10	13	5,72 x10 ⁵	0,191	1,4	7,22
10	14	6,16 x10 ⁵	0,192	1,7	7,24

Tabla 4: Concentraciones de plata añadida, cloruros añadidos y plata calculada (mg/L)

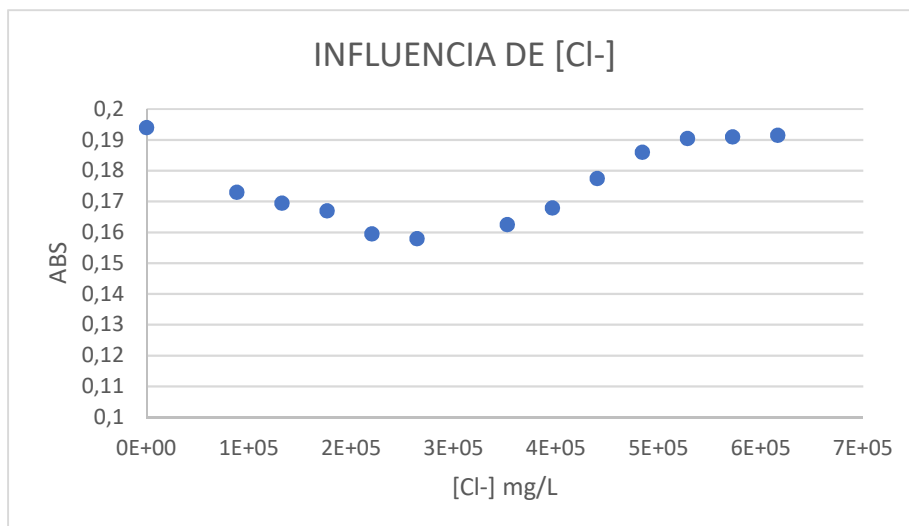


Figura 4: Representación de absorbancia frente a [Cl⁻] mg/L para el estudio de su influencia

En cada una de las disoluciones, se consiguen las siguientes relaciones estequiométricas de $\text{mol}_{\text{Ag}} : \text{mol}_{\text{Cl}^-}$

Ag(mol)	Cl ⁻ (mol)	RELACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA
$4,32 \times 10^{-7}$	0	1:0
$3,83 \times 10^{-7}$	0,0241	1: $6,30 \times 10^4$
$3,74 \times 10^{-7}$	0,0362	1: $9,67 \times 10^4$
$3,68 \times 10^{-7}$	0,0482	1: $1,31 \times 10^5$
$3,51 \times 10^{-7}$	0,0603	1: $1,72 \times 10^5$
$3,47 \times 10^{-7}$	0,0724	1: $2,08 \times 10^5$
$3,58 \times 10^{-7}$	0,0965	1: $2,69 \times 10^5$
$3,71 \times 10^{-7}$	0,108	1: $2,92 \times 10^5$
$3,93 \times 10^{-7}$	0,121	1: $3,07 \times 10^5$
$4,13 \times 10^{-7}$	0,133	1: $3,21 \times 10^5$
$4,24 \times 10^{-7}$	0,145	1: $3,41 \times 10^5$
$4,25 \times 10^{-7}$	0,157	1: $3,69 \times 10^5$
$4,26 \times 10^{-7}$	0,169	1: $3,96 \times 10^5$

Tabla 5: Relaciones estequiométricas entre los moles de plata y los moles de cloruros

Las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son que, al principio, cuando la concentración de cloruros es pequeña, el valor de la señal de absorbancia va disminuyendo, lo que significa que la concentración de plata en disolución cada vez es menor. Pero llega un momento en que se llega a un mínimo de absorbancia (cuando $[\text{Cl}^-] = 2,64 \times 10^5$ ppm) y a partir de ahí, comienza a aumentar de nuevo. Esto significa que la concentración de plata aumenta a partir de este punto. Este hecho está relacionado con la formación de los complejos solubles (AgCl_2^- y AgCl_3^{2-}).

A pesar de que se observa la variación de absorbancia esperada, no se consigue la recuperación completa de plata porque en todas las disoluciones sigue apareciendo precipitado, lo que implica que, a pesar de que los complejos solubles están en disolución, también sigue apareciendo el complejo no soluble (AgCl(s)).

No se ha podido determinar cuál es la concentración de cloruros necesaria para tener un exceso suficiente de ellos y así conseguir una redisolución completa del precipitado insoluble AgCl(s) .

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de plata en EAA-LLAMA

Para llevar a cabo la cuantificación de plata en las muestras de heces porcinas por EAA-llama, primeramente, se lleva a cabo el tratamiento de estas mediante la digestión ácida con HNO_3 (65%) descrito anteriormente. El volumen final de las disoluciones de las muestras es 10 ml. Para cada muestra se obtendrá un valor de absorbancia determinado que habrá que interpolar en la recta de calibrado (ver Anexo 3) y así obtener el valor de concentración correspondiente.

Se disponen de tres tipos de muestras que corresponden a tres cuadras diferentes, **cuadra 1**, **cuadra 6** y **cuadra 13**, siendo esta última la que no tiene plata. Se realiza la cuantificación de cada una de ellas obteniendo siete valores de concentración de plata para cada una en mg/L. Finalmente, se calcula el valor medio de los siete valores y el resultado que se obtiene corresponde a la concentración de plata en cada una de las tres muestras.

CUADRA 1

Muestra (g)	ABS	DSR %	[Ag] mg/L
0,0173	0,024	0,2	0,464
0,0145	0,021	0,4	0,348
0,0140	0,020	0,2	0,321
0,0116	0,020	1,1	0,300
0,0126	0,020	0,5	0,288
0,0147	0,022	1,3	0,348
0,0109	0,019	0,6	0,249
PROMEDIOS	0,021		0,331

Tabla 6: Valor promedio de concentración de plata en la muestra

CUADRA 6

Muestra (g)	ABS	DSR %	[Ag] mg/L
0,0155	0,025	0,2	0,470
0,0160	0,024	0,7	0,464
0,0156	0,024	0,3	0,463
0,0142	0,022	0,3	0,391
0,0145	0,023	0,1	0,416
0,0137	0,023	1,7	0,403
0,0106	0,021	0,9	0,314
PROMEDIOS	0,023		0,417

Tabla 7: Valor promedio de concentración de plata en la muestra

CUADRA 13

Muestra (g)	ABS	DSR %	[Ag] mg/L
0,0173	0,005	0,5	-0,310
0,0145	0,009	1,9	-0,128
0,0140	0,010	0,7	-0,104
0,0116	0,010	0,1	-0,0839
0,0126	0,010	0,3	-0,106
0,0147	0,009	1,2	-0,119
0,0109	0,010	0,6	-0,105
PROMEDIOS	0,009		-0,137

Tabla 8: Valor promedio de concentración de plata en la muestra

En este último caso se obtienen valores de concentración negativos debido a que la señal obtenida es muy pequeña. Los valores de concentración que se obtienen están por debajo del límite de cuantificación del método.

Los valores de concentración también pueden darse en mg/g para ello hay que tener en cuenta la siguiente conversión:

$$\frac{mg}{L} * \frac{1L}{1.10^3 ml} * 10 ml * \frac{1}{g_{muestra}}$$

	[Ag] mg/g
Cuadra 1	0,241
Cuadra 6	0,292
Cuadra 13	-0,0962

Tabla 9: Valores de concentración de plata en mg/g

5.2 Cálculo de la incertidumbre [11]

Un valor de concentración siempre tiene que ir acompañado de un valor de incertidumbre (U_T) que indica entre que valores puede oscilar el resultado final de concentración.

La incertidumbre total se calcula como la suma de todas las fuentes de incertidumbre que intervienen en el proceso para la determinación de la concentración. En este caso, para la determinación de plata en las muestras de heces porcinas hay que tener en cuenta la incertidumbre de las etapas de tratamiento de muestra, es decir, cada uno de los instrumentos, aparatos y materiales utilizados van a aportar una incertidumbre que viene especificada por el fabricante. También es necesario tener en cuenta la incertidumbre de la calibración y la desviación estándar de las medidas.

Todos los valores de desviaciones estándar se resumen en las siguientes tablas.

Instrumentos y materiales utilizados

Balanza	$\pm 0,2 \text{ mg}$
Pipeta 5 ml	$\pm 0,015$
Micropipeta 100 μL	$\pm 0,008$
Micropipeta 200 μL	$\pm 0,006$

Desviación de las medidas

SD de absorbancia en calibración	0,1
SD de la absorbancia en determinación	Cuadra 1: 0,06 Cuadra 6: 0,05 Cuadra 13: 0,07

Incertidumbre de la calibración

<u>Incertidumbre de la pendiente</u>	0,00143
<u>Incertidumbre de la O.O</u>	0,0145
<u>SD de regresión (ver Anexo 5) *</u>	0,0158

$$* S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - mx_i - b)^2}{N - 2}}$$

Para el cálculo del valor de incertidumbre total hay que tener en cuenta la ley de propagación de incertidumbres (ver Anexo 5), por lo tanto, es necesario sumar el cuadrado de todas las desviaciones estándar anteriores y hacer su raíz cuadrada.

$$U_T = \sqrt{\sum SD^2}$$

El único valor que varía en cada una de las cuadras para el cálculo de la incertidumbre total es la desviación de las medidas.

	[Ag] mg/L $\pm U_T$
Cuadra 1	0,331 \pm 0,233
Cuadra 6	0,417 \pm 0,231
Cuadra 13	-0,0962 \pm 0,236

Tabla 10: Resultados de concentración de plata en las muestras

6.VALIDACIÓN DEL MÉTODO

6.1 Estudio del efecto matriz

Para comprobar si existen efectos matriz se realiza una adición estándar. Para ello se preparan disoluciones que contengan la misma cantidad de muestra, a la que se añaden cantidades crecientes de disolución estándar de plata de concentración 1000 mg/L, enrasando a un volumen final de 10 ml.

Con estas disoluciones se obtendrá una recta cuya pendiente hay que comparar con la de la recta de calibración normal por medio de la aplicación de un test estadístico. Si se obtienen diferencias significativas entre los valores de las dos pendientes, habrá efectos matriz.

Con la finalidad de obtener resultados más representativos se lleva a cabo la adición estándar de cada tipo de muestra por triplicado.

RECTA DE CALIBRADO NORMAL

[Ag] _{estándar} mg/L	ABS	DSR %
0	0,002	0,7
1	0,026	0,3
2	0,038	0,1
5	0,082	1,4
7	0,122	0,8
8	0,143	0,3
10	0,168	0,2
12	0,183	0,2
15	0,216	0,5

Tabla 11: Valores para la obtención de la recta de calibrado

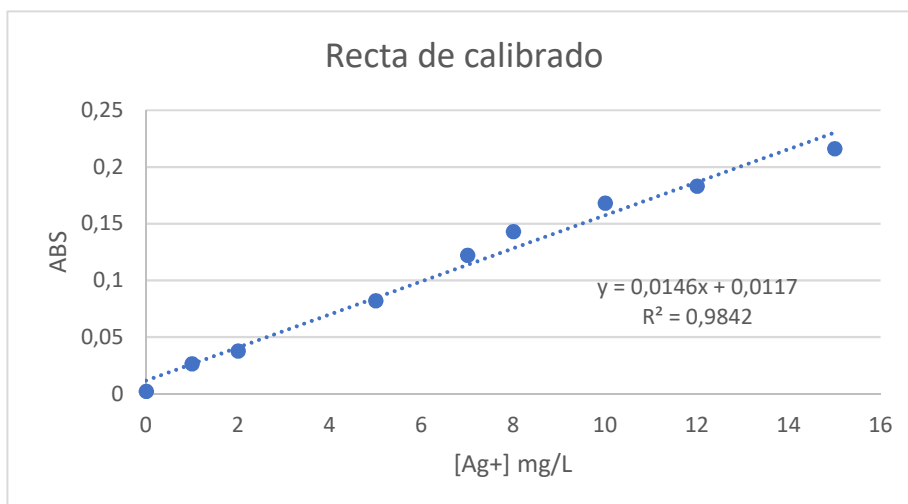


Figura 5: Recta de calibrado para el estudio del efecto matriz

	Valor	Incertidumbre
Pendiente	0,0146	0,00092
Ordenada origen	0,0117	0,00934

Tabla 12: Valores de la incertidumbre de la pendiente y de la ordenada en el origen

CUADRA 1

ADICIÓN ESTÁNDAR 1

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1058	0	10	0,019	0,9
0,1058	2	10	0,044	0,4
0,1058	4	10	0,078	1,1
0,1058	6	10	0,130	0,6
0,1058	8	10	0,176	0,3
0,1058	10	10	0,190	1,3

Tabla 13: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 1, cuadra 1

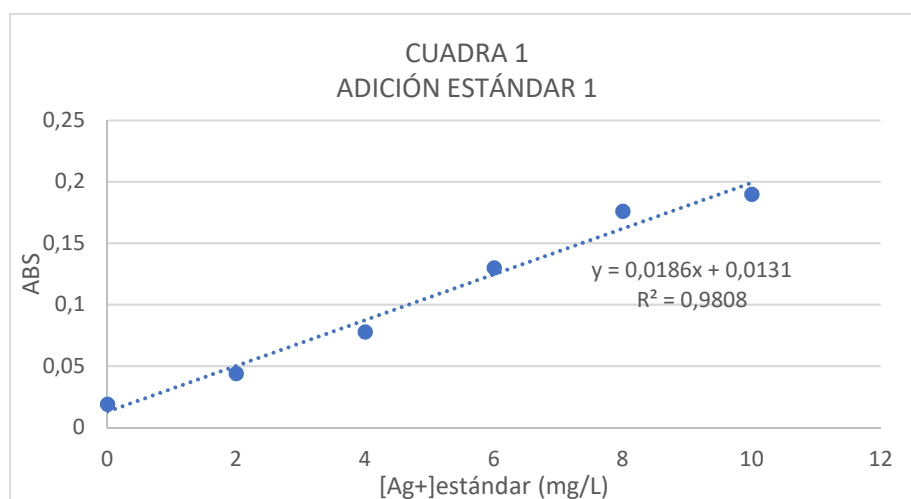


Figura 6: Recta de adición estándar 1, cuadra 1

La pendiente de esta recta es 0,00186 y su incertidumbre es 0,00130.

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 2

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1005	0	10	0,016	0,2
0,1005	2	10	0,053	0,4
0,1005	4	10	0,072	0,1
0,1005	6	10	0,126	0,8
0,1005	8	10	0,179	0,2
0,1005	10	10	0,185	0,6

Tabla 14: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 2, cuadra 1

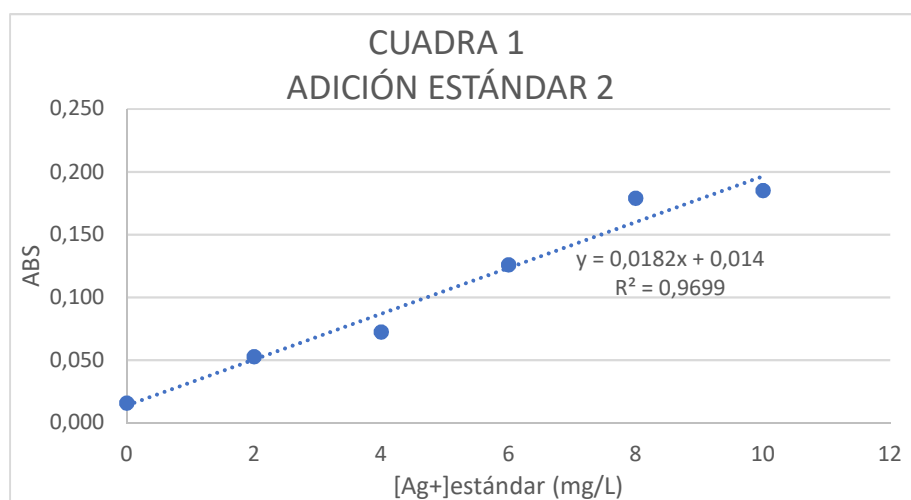


Figura 7: Recta de adición estándar 2, cuadra 1

La pendiente de esta recta es 0,00182 y su incertidumbre es 0,00161

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 3

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1072	0	10	0,018	1,5
0,1072	2	10	0,051	0,9
0,1072	4	10	0,077	0,7
0,1072	6	10	0,132	1,1
0,1072	8	10	0,184	0,3
0,1072	10	10	0,197	0,6

Tabla 15: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 3, cuadra 1

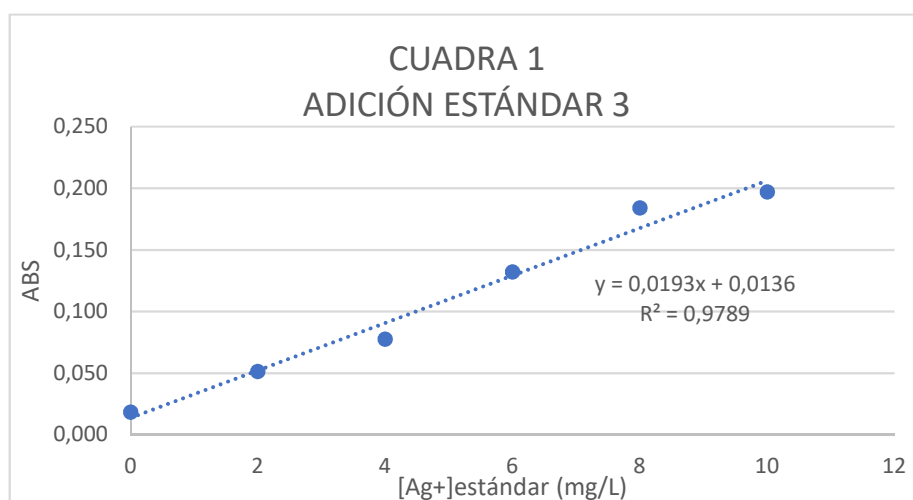


Figura 8: Recta de adición estándar 3, cuadra 1

La pendiente de esta recta es 0,00193 y su incertidumbre es 0,00141

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

CUADRA 6

ADICIÓN ESTÁNDAR 1

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1020	0	10	0,025	1,3
0,1020	2	10	0,057	1,9
0,1020	4	10	0,088	0,6
0,1020	6	10	0,144	0,8
0,1020	8	10	0,179	0,2
0,1020	10	10	0,206	1,7

Tabla 16: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 1, cuadra 6

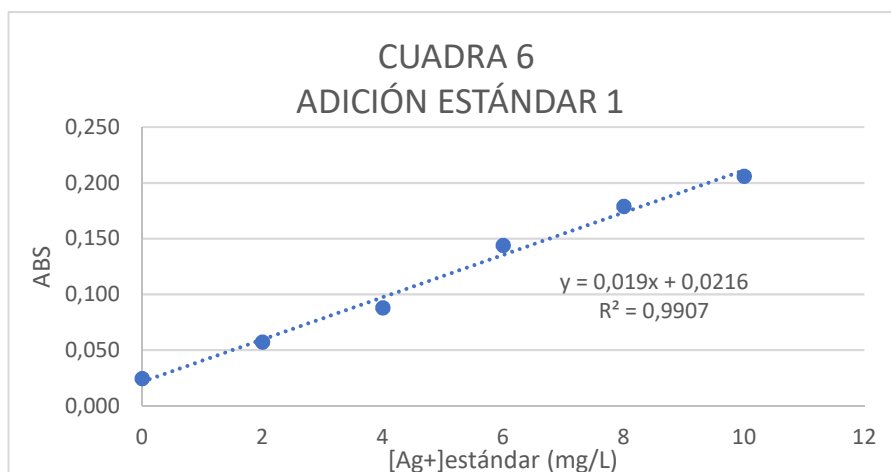


Figura 9: Recta de adición estándar 1, cuadra 6

La pendiente de esta recta es 0,00190 y su incertidumbre es 0,00092

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 2

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1009	0	10	0,020	1,4
0,1009	2	10	0,047	2,3
0,1009	4	10	0,085	0,3
0,1009	6	10	0,135	0,6
0,1009	8	10	0,176	0,7
0,1009	10	10	0,183	1,9

Tabla 17: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 2, cuadra 6

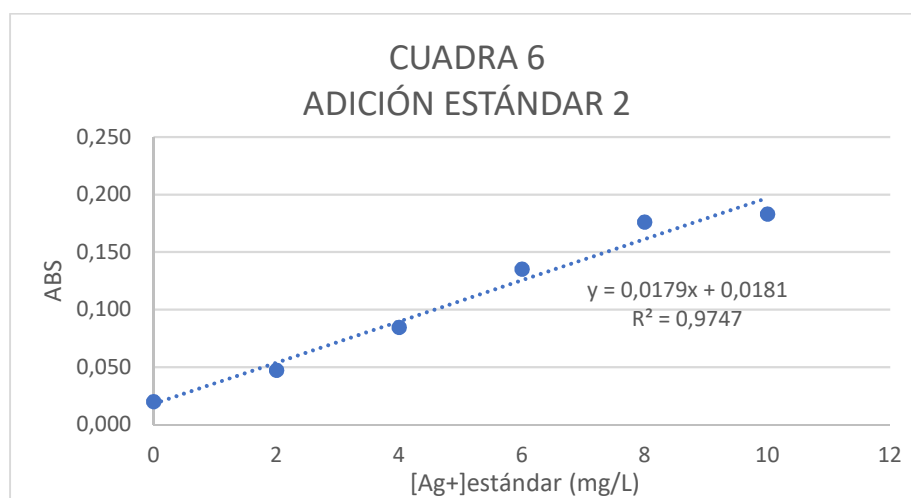


Figura 10: Recta de adición estándar 2, cuadra 6

La pendiente de esta recta es 0,00179 y su incertidumbre es 0,00144

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 3

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1011	0	10	0,022	0,6
0,1011	2	10	0,061	0,6
0,1011	4	10	0,092	0,9
0,1011	6	10	0,147	0,3
0,1011	8	10	0,168	2,7
0,1011	10	10	0,194	1,8

Tabla 18: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 3, cuadra 6

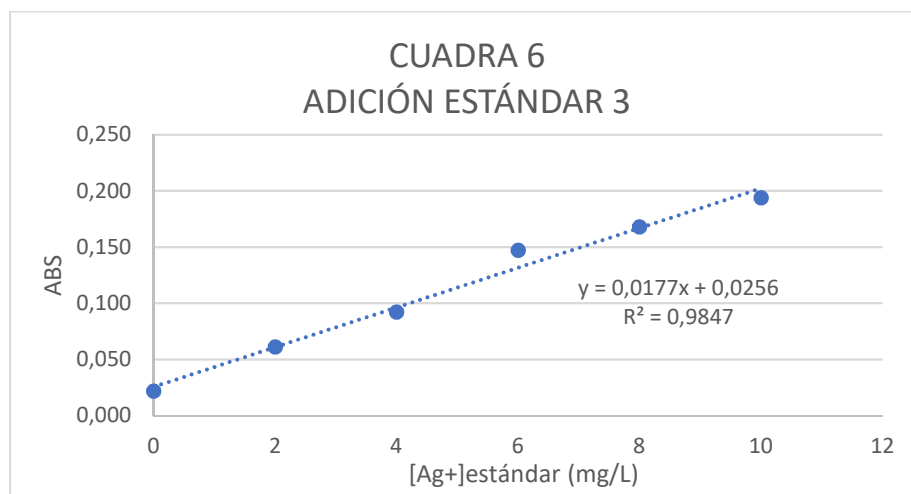


Figura 11: Recta de adición estándar 3, cuadra 6

La pendiente de esta recta es 0,00177 y su incertidumbre es 0,00110

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

CUADRA 13

ADICIÓN ESTÁNDAR 1

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1092	0	10	0,005	0,8
0,1092	2	10	0,026	0,3
0,1092	4	10	0,051	0,1
0,1092	6	10	0,099	1,5
0,1092	8	10	0,143	0,6
0,1092	10	10	0,171	1,4

Tabla 19: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 1, cuadra 13

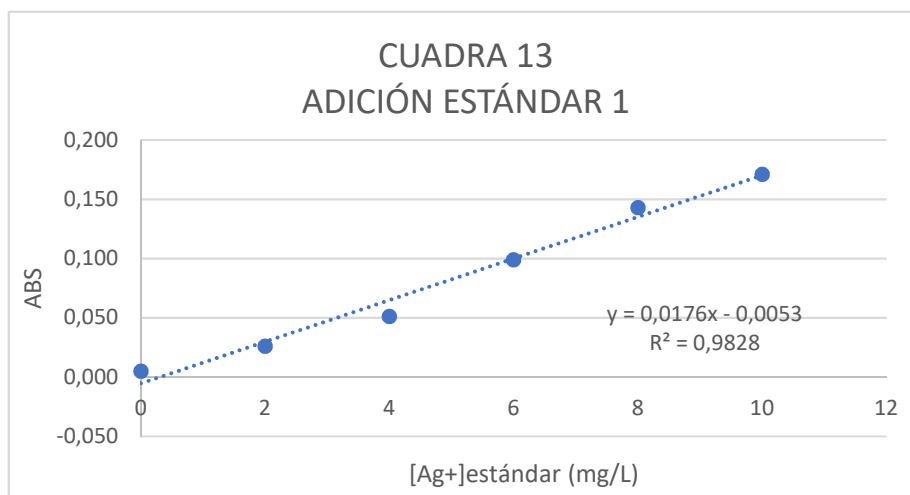


Figura 12: Recta de adición estándar 1, cuadra 13

La pendiente de esta recta es 0,00176 y su incertidumbre es 0,00116

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 2

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1009	0	10	0,003	0,2
0,1009	2	10	0,022	0,6
0,1009	4	10	0,041	1,7
0,1009	6	10	0,085	1,6
0,1009	8	10	0,138	2,2
0,1009	10	10	0,164	0,5

Tabla 20: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 2, cuadra 13

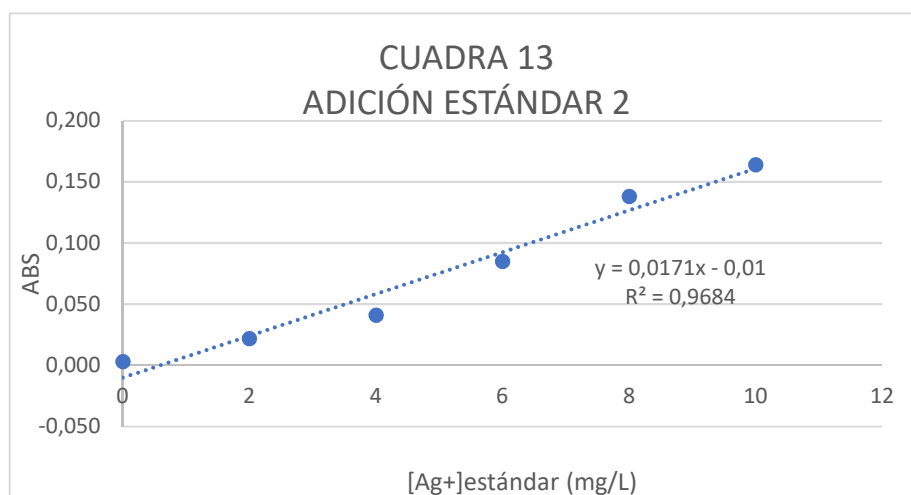


Figura 13: Recta de adición estándar 2, cuadra 13

La pendiente de esta recta es 0,00171 y su incertidumbre es 0,00155

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

ADICIÓN ESTÁNDAR 3

Muestra (g)	[Ag] _{estándar} (mg/L)	V _{total} (ml)	ABS	DSR %
0,1054	0	10	0,007	1,3
0,1054	2	10	0,032	0,7
0,1054	4	10	0,047	0,8
0,1054	6	10	0,080	1,2
0,1054	8	10	0,149	0,1
0,1054	10	10	0,173	1,9

Tabla 21: Valores para la obtención de la recta de adición estándar 3, cuadra 13

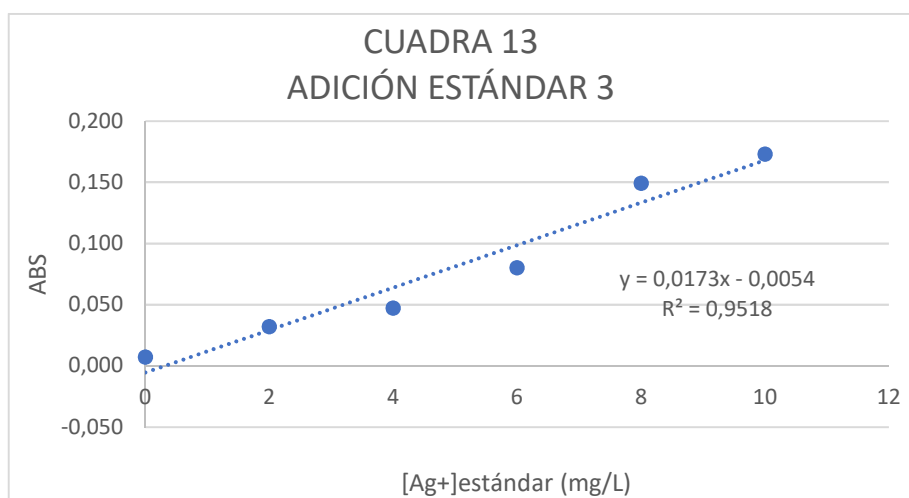


Figura 14: Recta de adición estándar 3, cuadra 13

La pendiente de esta recta es 0,00173 y su incertidumbre es 0,00195

Para decidir si hay efecto matriz se aplica un **test t** al 95% de nivel de confianza suponiendo varianzas comparables (2 colas). La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias significativas entre los valores de ambas pendientes. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) establece que existen diferencias significativas entre ellas.

Una vez realizado el test t, se obtiene que la probabilidad de que ambas pendientes sean iguales es de 0,00% por lo tanto se puede concluir al 95 % de nivel de confianza que existen diferencias significativas entre ambas pendientes y por lo tanto habrá efectos matriz.

6.2 Estudio de la recuperación

Para realizar el estudio de recuperación, es necesario tomar los valores obtenidos de concentración de plata para cada una de las cuadras. Así como los valores de concentración de plata obtenidos cuando a la disolución de la muestra se añade una concentración conocida de estándar de plata (1000 mg/L) (proceso realizado en la adición estándar). Como concentración de estándar añadida a la disolución de la muestra se ha elegido 4 mg/L.

Fórmula de la Recuperación [13]

$$R = \frac{[Ag]_{ad} - [Ag]_M}{[Ag]_{estándar}} * 100$$

Los porcentajes de recuperación deben encontrarse dentro del $100\% \pm 4S$ donde S es la mayor desviación estándar relativa obtenida en la medida [14].

CUADRA 1					
$[Ag]_{ad}$ (mg/L)	$[Ag]_M$ (mg/L)	$[Ag]_{estánd}$ (mg/L)	R (%)	S	R (%) acceptable
4,38	0,241	4	103,5	1,3	$100 \pm 5,2$

Tabla 22: Valor de recuperación para la cuadra 1

CUADRA 6					
$[Ag]_{ad}$ (mg/L)	$[Ag]_M$ (mg/L)	$[Ag]_{estánd}$ (mg/L)	R (%)	S	R (%) acceptable
5,25	0,292	4	123,9	1,7	$100 \pm 6,8$

Tabla 23: Valor de recuperación para la cuadra 6

CUADRA 13					
$[Ag]_{ad}$ (mg/L)	$[Ag]_M$ (mg/L)	$[Ag]_{estánd}$ (mg/L)	R (%)	S	R (%) acceptable
2,37	-0,096	4	61,65	1,9	$100 \pm 7,6$

Tabla 24: Valor de recuperación para la cuadra 13

En la cuadra 1 se puede observar que se cumple la condición y por lo tanto se obtienen buenas recuperaciones. Pero como en el estudio de la adición estándar de estas muestras se había concluido que había existencia de efectos matriz, la determinación se llevará a cabo mediante este método.

En la cuadra 6 se obtienen valores de recuperación mayores a lo aceptable, lo cual indica que habrá efectos matriz como ya se había concluido anteriormente en el estudio de la adición estándar. A la hora de la determinación se utilizará el método de la adición estándar para minimizar estos efectos.

Por último, en la cuadra 13 los valores de recuperación son muy bajos, esto puede ser debido a que el valor de concentración de plata que se obtiene está fuera de los límites de detección y cuantificación del método. Por lo tanto, la determinación por este método no sería adecuada para estas muestras.

7.CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método que permite la determinación de plata en muestras de heces de ganado porcino mediante espectroscopía de absorción atómica con llama, previa digestión ácida de las muestras liofilizadas con ácido nítrico.
2. Se han calculado los parámetros analíticos a partir de una disolución estándar de plata (1000 mg/L) en términos de exactitud, precisión y sensibilidad.

Rango lineal	Desde el LC hasta 15 mg/L
Límite de detección (mg/L)	0,0697 mg/L
Límite de cuantificación (mg/L)	0,232 mg/L
Sensibilidad	0,0248

3. Estudiadas distintas formas de disolución, se ha establecido la digestión ácida con HNO_3 (65%) como método de referencia. Lo que implica añadir 2,5 ml de este ácido a las muestras y calentar a 80°C durante 30 minutos. Tras comprobar la influencia de este ácido sobre la medida de la absorbancia en el espectrómetro de absorción atómica con llama, se ha concluido que la presencia de este no influye en el valor de absorbancia y por lo tanto la señal solo corresponde a la concentración de plata en la muestra.
4. La utilización de ácido clorhídrico solo y mezclado con HNO_3 para la disolución de la muestra no presenta ninguna ventaja respecto al método de referencia con ácido nítrico. Al llevar a cabo el estudio de la influencia de los cloruros en la determinación de plata, utilizando para ello la disolución de estándar de plata (1000 mg/L) e ir añadiendo concentraciones crecientes de cloruros, se concluyó que la absorbancia varía en función de la concentración añadida de cloruros. De manera que en un principio la absorbancia disminuye por la aparición del precipitado AgCl(s) (disminuye la concentración de plata) pero luego, la señal aumenta ya que se forman los complejos solubles de (AgCl_2^- y AgCl_3^{2-}) cuando los cloruros están en exceso.
5. Los resultados de la determinación de plata en las muestras son los siguientes:

	[Ag] mg/L
Cuadra 1	$0,331 \pm 0,233$
Cuadra 6	$0,417 \pm 0,231$
Cuadra 13	$-0,137 \pm 0,236$

6. Gracias a los estudios de adición estándar y de recuperación, se ha demostrado la existencia de efectos matriz, por lo tanto, es necesario la aplicación de la adición estándar para la determinación de plata en las muestras, y así minimizar estos efectos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lansdown, A.B., (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol* (33), 17-34.
- [2] Veverková, L., Hradilová, Š., Milde, D., Panáček, A., Skopalová, J., Kvítek, L., Petrželová, K., Zbořil, R., (2014). Accurate determination of silver nanoparticles in animal tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* (102), 7-11.
- [3] Karimi, M.A., Mohammadi, S.Z., Mohadesi, A., Hatefi-Mehrjardi, A., Mazloun-Ardakani, M., Sotudehnia Korani, L., Askarpour Kabir, A., (2011). Determination of silver (I) by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration using modified magnetite nanoparticles. *Scientia Iranica F*, 18(3), 790-796.
- [4] Fondevila, M., Herrer, R., Casallas, M.C., Abecia, L., Ducha, J.J., (2009). Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* (150), 259-269.
- [5] Gerondi, F., Zezzi Arruda, M.A., (2012). Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry for determination of silver in biological materials. *Talanta* (97), 395-399.
- [6] Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., (2004), *Fundamentals of Analytical Chemistry*, London, England: Thomson Learning.
- [7] Smith, R.M., Martell, A.E., (1976). *Critical Stability Constants*, vol 4, New York: Plenum Press
- [8] Rooney, R.C., (1975). The determination of silver in animals' tissues by a wet-oxidation process followed by atomic absorption spectrophotometry. *Analyst* (100), 471-475.
- [9] Xue, Y., Zhang, S., Huang, Y., Zhang, T., Liu, X., Zhangb, Z., Tanga, M., (2012). Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *Toxicol* (32), 890-899.
- [10] Perkin Elmer, Inc. (2008-2013). Atomic Spectroscopy- A Guide to Selecting the Appropriate Technique and System. Recuperado de https://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/BRO_WorldLeaderAAICPMSICPMS.pdf
- [11] Departamento de Química Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid. Incertidumbres de medida y tratamiento de datos experimentales. Recuperado de <http://www.qfa.uam.es/labqui/practicas/incertidumbres.pdf>
- [12] Gonzalo Barriga (2014). *Equilibrio Heterogéneo*. Apartado 12, efecto del ion común: distintos ejemplos. Recuperado de <https://slideplayer.es/slide/1022367/>
- [13] Rodríguez, S.C., Pellerano, R.G, Romero, C.H., Acevedo, H.A., Vázquez, F.A., (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata. *Revista Tumbaga* (7), 55-71.